

Über den Tyrosin-Stoffwechsel
bei der Wildform
und einer Albinomutanten von
Schistocerca gregaria Forskål

von

INGEBORG SCHLOSSBERGER

1961

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut

der Universität M ü n c h e n

Vorstand: Prof. Dr. Peter K a r l s o n

Über den Tyrosin-Stoffwechsel bei der

Wildform und einer Albinomutanten von

Schistocerca gregaria Forskal.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilian-Universität zu München

vorgelegt

von

Ingeborg Schlossberger geb. Raecke

aus Düsseldorf

1961



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Peter K a r l s o n

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Rudolf B a c h m a n n

Dekan: Prof. Dr. Walter S e i t z

Tag der mündlichen Prüfung: 10.10.1961

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von
Herrn Professor Dr. Peter K a r l s o n in der
Zeit vom 1.11.1958 bis 1.4.1960 im Physiologisch-
Chemischen Institut der Universität München angefertigt.

Herrn Professor Dr. Adolf B u t e n a n d t bin ich
für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, Herrn
Professor Dr. Peter K a r l s o n für sein fördern-
des Interesse und für seine wertvollen Ratschläge zu
großem Dank verpflichtet.

I n h a l t s v e r z e i c h n i s

A. Einleitung	S. 1
B. Material und Methoden	S.13
C. Ergebnisse	S.24
D. Diskussion	S.51
E. Zusammenfassung	S.56
F. Tabellarischer Anhang	S.58
Literatur-Verzeichnis	S.69

Über den Tyrosin-Stoffwechsel bei der Wildform
und einer Albinomutanten von Schistocerca gregaria Forskal.

A. EINLEITUNG

Die biochemische Genetik ist ein Wissenszweig, der sich zuerst an Beispielen aus der Insektenkunde entwickelt hat.

Nachdem es Alfred Kühn (1) gelungen war, eine Albinomutante der Mehlmotte *Ephestia Kühniella* zu züchten, konnte man an diesem Objekt grundlegende Versuche zum Problem des durch eine Mutation bedingten Verlustes der Pigmentbildung durchführen. Die Albinomutante unterscheidet sich von der Wildform von *Ephestia* durch das Fehlen von Pigmenten der Falteraugen, der Raupenaugen, der Raupenhaut und einiger anderer Organe. Nach Transplantation von Wildformorganen in Albino-Larven bildete sich bei den adulten Mutanten die gleiche Pigmentierung aus wie bei der Wildform.

In Zusammenarbeit mit Adolf Butenandt (2,3) und seiner Schule konnte das Problem von der biochemischen Seite analysiert werden. Die Pigmente der Wildform gehören zu den Ommochromen, deren Muttersubstanz Tryptophan ist.

Man kennt zwei biochemisch unterschiedliche Mutanten, bei denen der Reaktionsweg vom Tryptophan zu den Pigmenten an zwei verschiedenen Stellen unterbrochen ist. Bei der einen Mutante ist eine Stufe des Reaktionsweges vom Tryptophan zu den Ommochromen blockiert, bei der anderen fehlen spezifische Eiweiß-Träger, an die die Ommochrome gebunden werden.

Durch die Analyse dieser Gen-Wirkkette ergab sich, dass jeweils durch Mutation e i n e s Gens die Bildung e i n e s Stoffwechselproduktes unterbleibt, und zwar dadurch, dass die Bildung bzw. Aktivierung eines Enzyms unterbunden wird. Diese Ein-Gen - Ein-Enzym-Theorie konnte an vielen anderen Beispielen in der Zwischenzeit erhärtet werden (4, 5, 6, 7, 8).

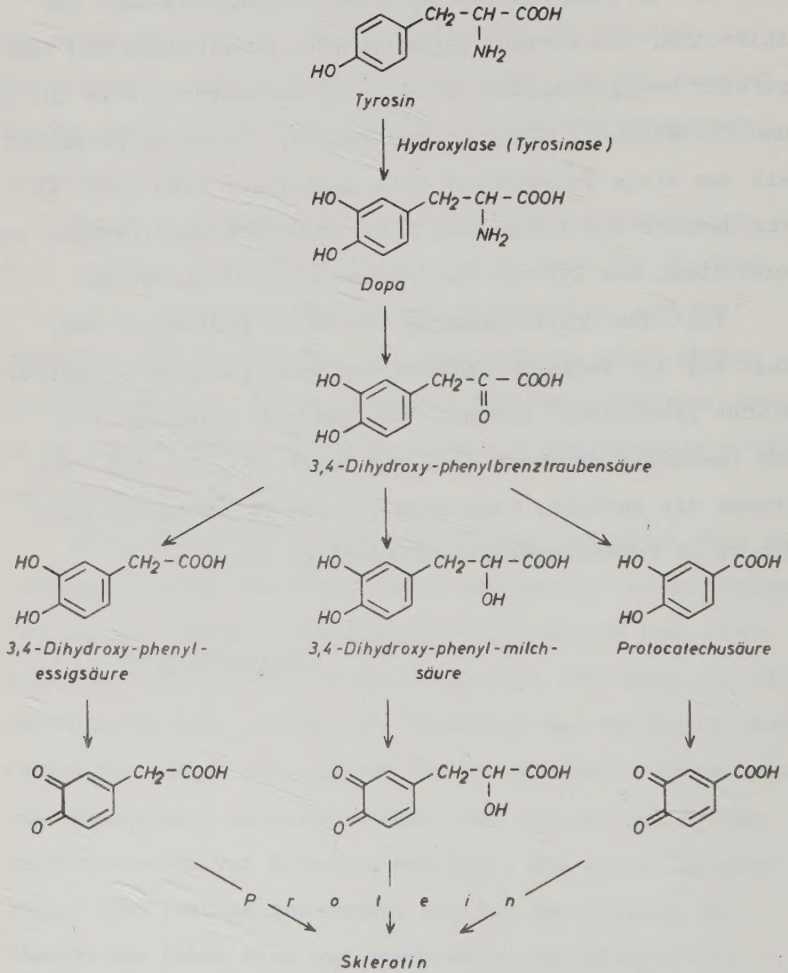
Falls die Genwirk-Kette durch Mutation eines Gens unterbrochen wird, und damit durch den Verlust eines Fermentes ein bestimmter Reaktionsschritt blockiert ist, wird sich das vorhergehende Reaktionsprodukt aufstauen und vermehrt nachweisen lassen. Bei Injektion des fehlenden Stoffwechselproduktes wird jedoch der normale Reaktionsmechanismus ungehindert ablaufen können. Das ist bei den beiden Albinomutanten von Ephestia der Fall. Bei einem "eingleisigen" Stoffwechselgeschehen, wie bei der Bildung der Ommochrome lässt sich auf diese Weise der Wirkungsort einer Genmutation feststellen.

Komplizierter wird die Auswirkung von Mutationen bei einem "verzweigten" Stoffwechselsystem, d.h., dann,

wenn eine Substanz Ausgangspunkt für verschiedene Stoffwechselprodukte ist. Solch ein Fall liegt z.B. beim Tyrosin vor. Tyrosin ist bei Insekten Ausgangssubstanz für Sklerotin, dem festen, gegen Wasser, Chemikalien und Temperatur unempfindlichen Anteil der Insektencuticula (9, 10), und für Melanin, einem hochpolymeren, schwarzen Farbstoff, mit dem viele Insektencuticeln ausgefärbt sind (11). Es war deshalb von besonderem Interesse, die Auswirkungen von Mutationen des Tyrosin-Stoffwechsels zu untersuchen.

Seit den Untersuchungen von Raper (12) weiss man, dass bei der Melanin-Synthese ein Phenol-Oxydase-Komplex, bisher "Tyrosinase" genannt, massgeblich beteiligt ist, und besonders Hackmann (13) und Pryor (14, 15, 16) vertraten die Ansicht, dass auch für die Sklerotin-Bildung der selbe Fermentkomplex erforderlich ist.

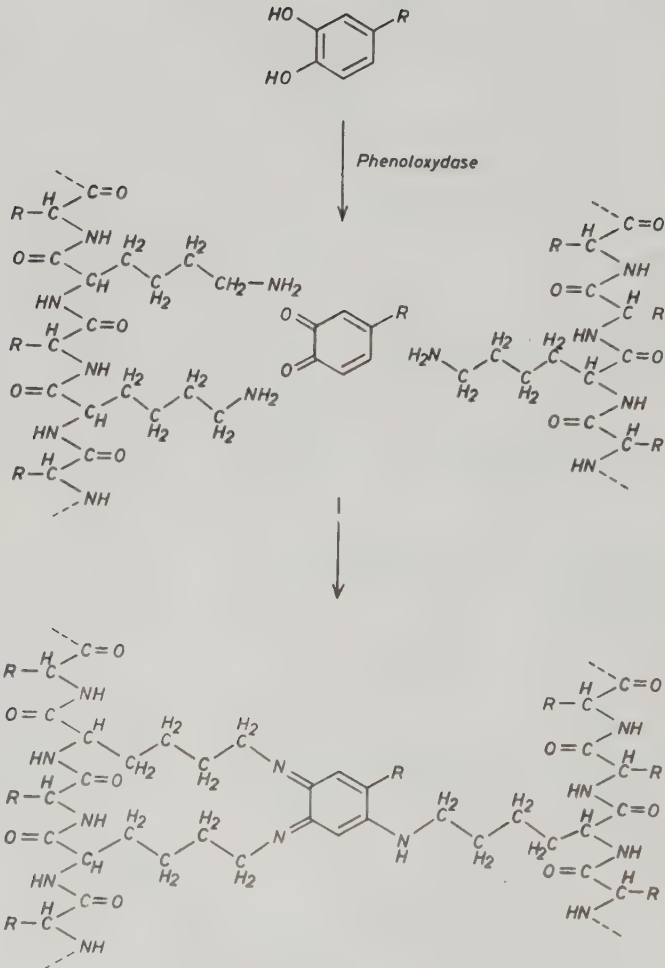
(Schema s.S.4)



Schema 1: Sklerotin-Synthese.

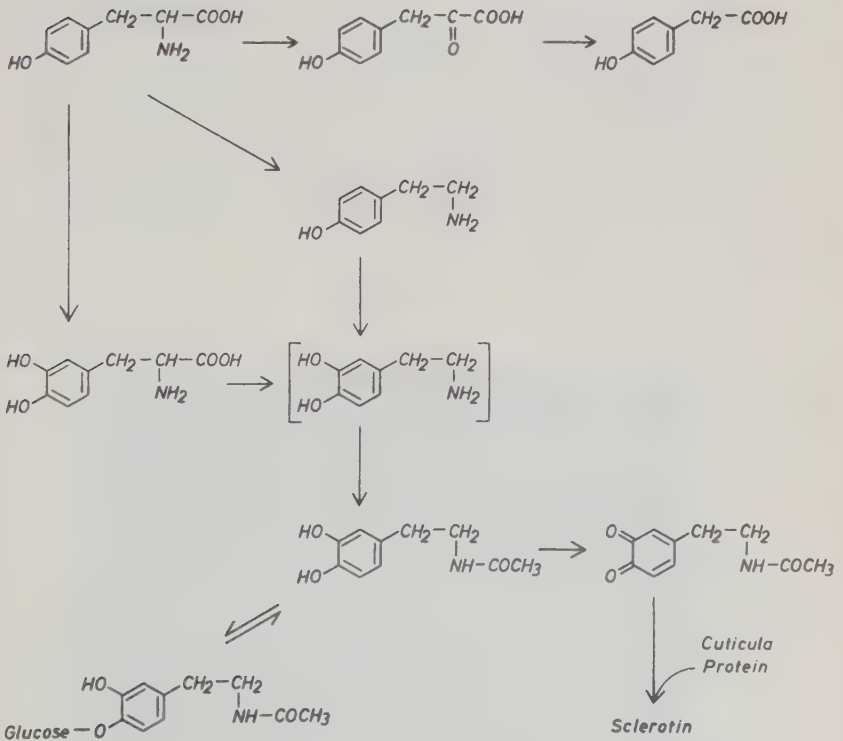
Der in dem Schema 1 aufgezeichnete Reaktionsweg vom Tyrosin zum Sklerotin wurde von mehreren Autoren postuliert (17,18). Dabei wurde zunächst Tyrosin zu 3,4-Dihydroxy-phenylalanin (Dopa) hydroxiliert. Der Weg verläuft weiter über 3,4-Dihydroxyphenyl-l-phenylalanin, 3,4-Dihydroxy-phenylmilchsäure, 3,4-Dihydroxy-phenylelessigsäure und Protocatechusäure gebildet werden. Die drei letzten Produkte werden zu den entsprechenden o-Chinonen oxydiert und vernetzen sich mit den Proteinen der Cuticula zum äußerst widerstandsfähigen, hochpolymeren Sklerotin (19,20). (Schema 2, R - Benzoquinon-1,2-essigsäure-4, Benzoquinon-1,2-milchsäure-4 und Benzoquinon-1,2-carbonsäure-4)

(Schema s.S.6)



Schema der Sklerotisierung.

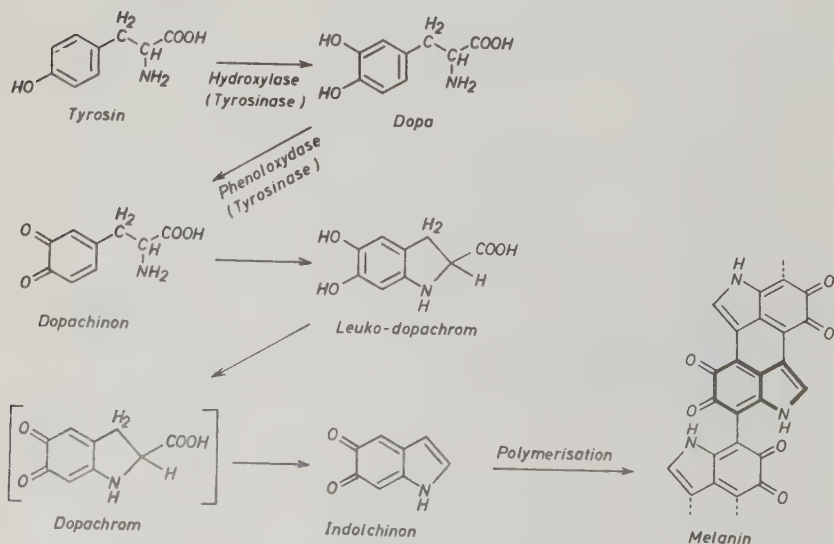
Im Gegensatz hierzu gelang es kürzlich P.Karlson und K.Sekeris (21) für die Pupariumbildung der Schmeißfliege *Calliphora erythrocephala* einen anderen Reaktionsweg der Sklerotinbildung nachzuweisen (Schema 3).



Schema 3: Sklerotin-Synthese nach Karlson und Sekeris
(aus der Dissertation K.Sekeris 1961)

Hierbei wird Tyrosin ebenfalls zu Dopa hydroxyliert, jedoch nicht unter der Einwirkung der Tyrosinase, sondern einer spezifischen Phenolhydroxylase. Danach wird Dopa zum Dopamin (β ,4-Dihydroxy-phenyl-äthylamin) decarboxyliert, das zum N-Acetyl-Dopamin acetyliert wird. Das N-Acetyl-Dopamin gelangt in die Cuticula und wird von der dort vorhandenen Phenoloxydase (bisher mit Tyrosinase bezeichnet) zum Chinon oxydiert. Das Chinon vernetzt sich mit den Cuticula-Proteinen zum Sklerotin (Schema 2: R = N-Acetyl-Dopamin-Chinon).

Von der Sklerotin-Synthese zweigt die Melaninbildung (18, 24) (Schema 4)



Schema 4 : Melanin-Synthese.

auf der Stufe des Dopa ab, das hierbei zum Dopachinon oxydiert wird, aus dem unter Ringschluss das Indol-Derivat Leuko-Dopachrom entsteht. Von dieser Verbindung führt der weitere Weg über Dopachrom und 5,6-Dihydroxy-Indol zum Indol-Chinon-(5,6), das in unterschiedlicher Weise spontan zu Melanochrom polymerisiert und mit den spezifischen Eiweißträgern Melanin bildet.

Die beiden Stoffwechselwege des Tyrosins finden in vielen Insekten während der Verpuppung oder Häutung zur selben Zeit statt. Malek untersuchte, ob sie gemeinsam (23) oder unabhängig voneinander verlaufen. Er verwandte dazu die Wüstenheuschrecke *Schistocerca gregaria* Forskal. Von *Schistocerca Gregaria* kennt man die Wildform (Bild 1) ,



Bild 1: Wildformlarve im 5.Stadium.

deren Larven ein wohlausgeprägtes, melaninhaltiges Muster auf den Abdominalsegmenten, den Gliedmaßen und Flügelscheiden

aufweisen, und eine Albinomutante (Bild 2),



Bild 2: Albinolarve im 4. Stadium

die vom ersten Larvenstadium bis zum adulten Tier fahlgelb und ohne Muster bleibt. Ihre Züchtung gelang Hunter-Jones (24). Bei den Imagines der Wildform ist das Melanin nur noch auf Flügel, Mandibeln und Krallen beschränkt.

Malek schloss aus den Ergebnissen seiner histochemischen Versuche, dass beide Wege des Tyrosin-Stoffwechsels unabhängig voneinander verlaufen, ohne das Verhältnis der beiden Reaktionswege zueinander näher zu charakterisieren.

In der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, durch andere Versuchsanordnungen nähere Einblicke in den Tyrosin-Stoffwechsel von Schistocerca zu gewinnen, insbesondere hofften wir, den Erfolgsort der Genmutation bei der Albinomutanten feststellen zu können.

Für das Ausbleiben der Melanin-Synthese bei den Albinos sind folgende Möglichkeiten zu diskutieren:

1. Bei den Albinos ist ein Reaktionsschritt der Melanin-Synthese blockiert.

Nach der eingangs erwähnten Theorie, dass ein Gen die Bildung oder Aktivierung eines Enzyms bewirkt, könnte das Fehlen der Melaninproduktion bei der Mutanten darauf beruhen, dass durch die Genmutation die Bereitstellung eines hierfür notwendigen Fermentes verhindert ist. Hierbei lag es nahe, an eine fehlende Aktivität des Phenolasekomplexes bei der Melaninbildung zu denken. Es ist jedoch durchaus nicht ausgeschlossen, dass die Blockierung der Melanin-Synthese durch das Auftreten von Inhibitoren bedingt ist. Die Inhibitoren könnten spezifisch für die Albinos sein, oder sie könnten auf das gleiche System zurückzuführen sein, das bei den Imagines der Wildform die Melaninbildung zugunsten der Bildung anderer Insektenfarbstoffe verhindert.

2. Der Tyrosin-Stoffwechsel ist bei der Albinomutante in quantitativer Hinsicht reduziert.

Es stehen der Mutante nur so viel Vorprodukte zur Verfügung, dass allein der Weg der Sklerotinbildung, evtl. gegenüber der Wildform noch in verringertem Ausmaß, beschritten wird. Diese Möglichkeit würde auf eine Aktivitätsminderung eines oder mehrerer für den normalen Tyrosin-Stoffwechsel notwendiger Fermente hinweisen.

3. Die Bereitstellung spezifischer Eiweißträger, an die das Melanin gebunden wird, kann unterbleiben.

In diesem Fall würde sich der Tyrosin-Stoffwechsel bei Albinos und Wildform nicht unterscheiden.

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Klärung der beschriebenen Probleme folgende Versuche durchgeführt:

1.) Es wurden radioaktive Vorstufen injiziert (Tyrosin, Dopa) und die Verteilung der Aktivität auf Sklerotin und Melanin gemessen. Diese Versuche sollten einen Einblick in die Aktivität des Tyrosin-Stoffwechsels der beiden Formen von *Schistocerca gregaria* geben.

2.) Die Tyrosinaseaktivität in der Hämolymphe von Larven und Imagines der Wildform und Mutante wurde bestimmt.

Hierdurch sollte ein Fehlen oder eine verminderte Aktivität des Phenolasekomplexes bewiesen oder verneint werden.

3.) Die Höhe des freien Tyrosinspiegels während der Zeit der Häutung wurde bei Wildformvertretern und Albinos bestimmt. Ist der Tyrosinspiegel bei den Albinos niedriger als bei der Wildform, so muss der genetische Block schon vor der Bildung des Dopa liegen. Ist der Tyrosinspiegel bei den Albinos höher, so könnte zum Beispiel eine mangelhafte Hydroxylierung zum Dopa dafür verantwortlich sein.

4.) Hohe Dosen von Dopa und Tyrosin wurden Albinolarven verabreicht. Falls die Mutation nur eine zu geringe oder gar eine fehlende Bereitstellung dieser beiden Vorprodukte bedingt, müssten sich nach der Injektion die Albinos ausfärben.

5.) Hämolymphe von Wildformlarven wurde Albinosinjiziert; damit könnte evtl. ein fehlendes Ferment auf die Albinos übertragen werden.

6.) Hämolymphe von Albinos wurde Wildformlarven injiziert. Bei diesen Versuchen würde ein in der Hämolymphe vorhandener Inhibitor übertragen werden.

B. MATERIAL UND METHODEN.

Zuchten von *Schistocerca gregaria* Forskal (24):

Normaltiere und Albinos von *Schistocerca gregaria* überliess mir freundlicherweise das Anti Locust Research Centre in London. Die Tiere befanden sich im 2. - 4. Larvenstadium.

Die Tiere wurden in etwa $0,75 \text{ m}^3$ grossen Holzkästen, die tagsüber von einer Heizlampe auf 30° C erwärmt wurden, gehalten. Nachts sank die Temperatur im Zuchtraum auf $20 - 25^\circ \text{ C}$. Gefüttert wurden beide Zuchten im Sommer mit frischem Gras, Weizenschrot und Wasser, im Winter wurde das Gras durch Salat ersetzt.

Die Entwicklung von *Schistocerca gregaria* dauert etwa 40 - 50 Tage von der Eiablage bis zum geschlechtsreifen Tier. Sie umfasst das Embryonalstadium, fünf Larvenstadien und die ersten 14 Tage des Imagostadiums. Bereits im ersten Larvenstadium ist die Grundform der imaginalen Gestalt erkennbar. Die Larve wächst hauptsächlich während der Häutung. Während der Larvenstadien entwickeln sich langsam die Flügel, die in den Flügelscheiden eng zusammengefaltet liegen und erst nach der letzten Häutung ausgebreitet werden. Nur das adulte Tier ist flugfähig.

Die Dauer der einzelnen Larvenstadien ist unterschiedlich, in den ersten Stadien verweilt das Tier kürzer als in den letzten. Durch Erniedrigung der Temperatur

kann man alle Stadien erheblich verlängern. Bei 30° C Tagestemperatur dauern die Stadien 2 - 8 Tage. Bei gleichen Umwelteinflüssen benötigen die Albinos etwas mehr Zeit zu ihrer Entwicklung als die Normaltiere.

Für die Versuche verwendete ich Tiere des 3., 4. und 5.Larvenstadiums sowie junge Imagines.

Methoden zur Messung der Radioaktivität injizierter, markierter Vorstufen (Tyrosin bzw.Dopa).

a.Injektion und Präparation.

Wildform- und Albinolarven des 3., 4. und 5.Stadiums wurde mit einer Desaga-Glasmikroinjektionsspritze 0,02 oder 0,05 ml einer aktiven Tyrosin- bzw.Dopalösung ins Abdomen injiziert. Die Tiere wurden möglichst so ausgewählt, dass sie sich bald nach der Injektion häuteten. Die auf die Injektion folgende Häutung wurde als Fixpunkt für die Zeit angenommen. Die Tiere wurden entweder kurz vor oder 3, 12, 24 oder 48 Stunden nach der Häutung getötet.

Die Cuticula der getöteten Tiere wurde sorgfältig von der Muskulatur, dem Fettkörper und dem Darminhalt befreit. Sie wurde mechanisch gesäubert, mehrmals in Petroläther und Aqua dest. gewaschen und über P_2O_5 im Exsikkator getrocknet.

Der Körperinhalt wurde auf die gleiche Weise getrocknet.

8. Nachweis des aktiven Materials.

a) Verbrennungsmethode und Zählen der Aktivität im erhaltenen Bariumkarbonat.

Von der Cuticula und dem getrockneten Körperinhalt jeder Heuschrecke wurden 2 - 3 feuchte Veraschungen nach einer etwas abgewandelten Methode der van Slyke-Folchschen Verbrennung gemacht (25). Das gewonnene, markierte CO_2 wurde als Bariumkarbonat gefällt und seine Impulse im Methan-Durchflusszähler gemessen.

Von jeder Verbrennung wurden drei BaCO_3 -Präparate hergestellt, so erhielt man je Cuticula und Körperinhalt eines Tieres 6 - 9 Werte.

Van Slyke-Folchsche Verbrennung:

Reagentien: Chromsäuregemisch aus 25 g CrO_3 , 167 ml H_3PO_4 (85%ig), 333 ml H_2SO_4 rauchend mit 20 % SO_3 .

Die organische Substanz, die auf ihren Gehalt an markiertem Kohlenstoff geprüft werden soll, wird zuzüglich 300 mg KJO_3 in ein Verbrennungskölbchen eingewogen. Das Ganze wird in CO_2 -freier Atmosphäre mit 5 ml des van Slyke-Folchschen Verbrennungsgemisches versetzt und zum Sieden erhitzt. Das entwickelte CO_2 wird über Glaswolle, schwach saure Hydrochinonlösung und Magnesiumperchlorat zur Absorption von Säurenebeln, Sauerstoff und Wasserdampf geleitet, in CO_2 -freier Natronlauge aufgefangen und durch Differenzwägung bestimmt. Anschliessend fällt man das

markierte CO_2 als Bariumkarbonat, trocknet es bei 80°C im Trockenschrank, wiegt es und misst seine Radioaktivität im Zählrohr.

Berechnung der Impulse pro mg organischer Substanz (26,27):

Die verwendeten Zähler notierten entweder die gemessenen Impulse bei konstanter Zeit, oder die abgelaufene Zeit bei konstanter Impulszahl. Von beiden Werten lässt sich die Impulszahl des gesamten Bariumkarbonat-Präparates in der Minute errechnen. Der Nulleffekt des jeweiligen Zählers wird abgezogen und die Impulszahl pro mg Bariumkarbonat in der Minute berechnet. Da die Bariumkarbonatschicht Impulse absorbiert, muss man die gemessenen Zahlen auf unendlich dünne Schicht korrigieren, um vergleichbare Werte zu erhalten. Dies geschieht nach der Gleichung für die Selbstadsorptionskonstante von BaCO_3 : $y = \frac{1 - e^{-x}}{x}$

Dabei gilt: $x = \frac{\mu}{F \cdot s}$,

$\mu = 0,285$ (Selbstabsorptionskoeffizient), F = Fläche des BaCO_3 , s = Gewicht des BaCO_3 . Man erhält eine Korrekturgrösse, die kleiner als eins ist. Dividiert man die Impulszahl pro mg BaCO_3 durch die jeweilige Korrekturgrösse, so erhält man die für den Messapparat spezifische Aktivität. Von der spezifischen Aktivität des BaCO_3 wird auf die Gesamtaktivität der eingewogenen organischen Substanz

geschlossen und danach werden die Impulse pro mg organischer Substanz berechnet.

b. Radioautographien von mikroskopischen Präparaten von Heuschreckenabdomina, Brustschilden und Gliedmassen nach Injektion von generell markiertem Tyrosin.

Das markierte Tyrosin wurde den Tieren wie oben geschildert ins Abdomen injiziert. Danach wurde die nächste Häutung abgewartet und einige Stunden später wurden die Tiere getötet.

Von den Abdomina, den Gliedmassen und den Brustschilden der Tiere wurden 10 μ dicke, histologische Schnitte hergestellt. Hierfür wurden die Teile der Heuschrecken fixiert, entwässert und in Paraffin eingebettet. Mit einem Mikrotom wurden 10 μ dicke Schnitte von den so präparierten Tieren gemacht. Die Schnitte wurden mit Eiweissglycerin auf Objektträger aufgeklebt, mit Xylol entparaffiniert und das Xylol anschliessend mit Wasser und Alkohol entfernt.

Die Radioautographien dieser Schnitte wurden mit der Strippingfilmmethode nach Pelc, Boyd und Mac Donald gewonnen (28):

Zunächst wurden die Objektträger, auf denen sich die aufgeklebten Präparate befanden, in eine 0,5%ige Gelatine-lösung, die einen Zusatz von 0,05% Chromalaun enthielt, getaucht. Es bildete sich ein dünner Film über dem Präparat, der sowohl das Präparat vor der Photoschicht als

auch die Photoschicht vor dem Präparat schützt.

Der Strippingfilm besteht aus einer 10 μ dicken Gelatineschicht und einer 5 oder 12 μ dicken Emulsionsschicht. Zur Aufbewahrung klebt der Film mit der Gelatineschicht auf einer Glasplatte.

Wenn der Film benutzt werden soll, werden in der Dunkelkammer mit einem Rasiermesser Stücke von der Glasplatte entfernt und mit der Photoschicht nach unten auf eine Wasseroberfläche gebracht. Die entfernten Stücke sollen möglichst die gleiche Grösse wie das Präparat haben. Nach einigen Minuten wird das auf dem Wasser liegende Stück des Films mit dem Objektträger, auf dem das Präparat klebt, so unterfahren und aus dem Wasser herausgenommen, dass die Photoschicht in direktem Kontakt mit dem Präparat ist.

Man trocknet das Präparat und die aufgeklebte Photoschicht langsam an der Luft und bewahrt sie zur Exposition in einem lichtundurchlässigen Kasten auf. Nach der Expositionszeit wird der Film mit einem Hydrochinonentwickler, der einen Zusatz von Natriumsulfit, Natriumkarbonat und Kaliumbromid enthält, entwickelt und anschliessend fixiert.

Es wurde Kodak Autoradiographic Stripping Plates AR.10 benutzt. Dieser Strippingfilm hat eine Emulsionsschicht von 5 μ und ein Auflösungsvermögen von 2 μ .

c. Direkte Aktivitätsmessungen in Heuschreckenflügeln
Kontrolle zu a und b.

Einzelne Flügelanteile von Heuschrecken, die im 5. Larvenstadium injiziert worden waren, wurden mit Hilfe von Wachs auf Meßschälchen aufgeklebt und ihre Aktivität direkt im Zählapparat gemessen. Dann wurde die Impulszahl pro mg Flügel errechnet und verglichen. Diese Aktivitätsbestimmung ist wesentlich ungenauer als die mit Hilfe der Verbrennungsmethode, da die Flügel in verschiedenen Abschnitten unterschiedlich dick sind, also auch unterschiedlich viel Impulse absorbiert werden. Ausserdem war keine Berechnungsart für die Absorptionskonstante von organischem Material bekannt. Die Messungen galten nur der Übersicht und dem Vergleich von melaninhaltigen und farblosen Flügelanteilen.

2. Bestimmung der Tyrosinaseaktivität in Heuschreckenhämolymph (nach Markert, Horowitz und Fling) (29).

Unter dem katalysierenden Einfluss der Tyrosinase entsteht bei der Oxydation von Dopa ziemlich rasch das rotgefärbte Zwischenprodukt Dopachrom. Die Extinktion des Dopachrom kann man im Photometer bei $480\text{ m}\mu$ (Cadmiumlampe) messen. Sie steigt in gleichen Zeitabständen linear an und ist proportional zur Tyrosinasekonzentration.

Verwendet man statt Dopa Brenzkatechin als Substrat für die Tyrosinase, so bildet sich ebenfalls ein Oxydationsprodukt, dessen Extinktion bei $480\text{ m}\mu$ im Photometer messbar ist.

Reagentien: 0,065 m Phosphatpuffer pH 8,8

wässrige Dopa- oder Brenzkatechinlösung 0,1%

wässrige Kupfersulfatlösung 1/100 n

Heuschreckenhämolymphe.

Ausführung: Zur Gewinnung möglichst reiner Hämolymphe werden die Heuschrecken mit einer Injektionsnadel oberhalb des Afters ins Abdomen gestochen. Die Tiere kontrahieren sich dann ein wenig und aus der Wunde tritt reine Hämolymphe aus. Nach der Operation leben die Tiere unbekümmert weiter, lediglich ein schwarzer Fleck an der Einstichstelle erinnert an die Blutentnahme. Ganz interessant ist, dass auch Albinos nach Verletzung die schwarzen, melaninhaltigen Flecke zeigen.

Zum Test gibt man in eine Küvette aus optischem Spezialglas (Schichtlänge 20 mm) 4 ml Phosphatpuffer

1ml Dopa- oder Brenzkatechinlösung

0,5 ml Kupfersulfatlösung

frische Hämolymphe von
3 Heuschrecken (=0,2 ml)

Das Ganze wird umgeschüttelt und in Abständen von einer Minute gemessen.

Verwendet wurde die Hämolymphe von Larven des 4. Stadiums und von jungen Imagines beider Rassen.

3. Bestimmung des freien Tyrosins zur Zeit der Häutung (30).

Hierzu wurden Larven des 5. Stadiums kurz vor der Häutung zur Imago und junge, 3 - 24 oder 24 - 48 Stunden alte Imagines getötet. Der Körperinhalt der Tiere wurde mit 4,2 n Perchlorsäure mehrmals aufgeschwemmt und der Überstand mit 4,2 n Kalilauge neutralisiert. Dann wurde nach der Methode von Lugg der Tyrosingehalt photometrisch bestimmt.

Tyrosinbestimmung nach Lugg:

Reagentien:

1. 5 n Schwefelsäure
2. 75 g HgSO_4 , 55 g HgCl_2 und 70 g Na_2SO_4 werden in 850 cm³ Wasser und 125 g Schwefelsäure gelöst und mit Wasser auf ein Liter verdünnt.
3. Eine Mischung von gleichen Teilen der Quecksilbersalzlösung 2) und n-Schwefelsäure.
4. 12 g HgSO_4 und 9 g HgCl_2 werden in 600 g H_2O und 100 g konz. H_2SO_4 gelöst. Man setzt unter Kühlen weitere 500 g H_2SO_4 zu und verdünnt zuletzt mit H_2O auf 1 Liter.
5. 6,9 %iges NaNO_2 .
6. Standardlösungen: 0,025 - 0,1 %ige Tyrosinlösungen in 0,1 n - H_2SO_4 zur Anfertigung einer Eichkurve.

Ausführung:

In einem 15 cm³-Zentrifugenglas werden 3 cm³ der zu untersuchenden Lösung mit so viel 5 n - H_2SO_4 versetzt, dass ein pH von 0,3 erreicht wird. Die benötigte Menge stellt man durch Titration einer weiteren Probe der

unbekannten Lösung unter Verwendung von Brillantkresylblau als Indikator fest. Dann wird mit n-Schwefelsäure auf 5 cm^3 verdünnt. Nach Zusatz von 5 cm^3 des Quecksilberreagenzes 2) wird das Glas für 30 Minuten in ein Wasserbad von $60 - 65^\circ$ gestellt. Man kühlt 1 Stunde in Wasser, das eine Temperatur hat, die $1 - 2^\circ$ unter der Zimmertemperatur liegt und zentrifugiert. Der klare Überstand wird in einen 25 cm^3 Meßzylinder gegossen. Der Niederschlag wird mit 10 cm^3 der Quecksilbersalzlösung 3) unter Aufwirbeln ausgewaschen und die Waschflüssigkeit zu dem Überstand gegeben. Dann wird mit Reagenz 3) auf $24,5\text{ cm}^3$ aufgefüllt. Zuletzt gibt man langsam $0,5\text{ cm}^3$ Nitrit in den Zylinder, so dass damit die Lösung überschichtet wird. So rasch wie möglich mischt man die Lösung anschliessend durch und kolorimetriert nach 3 Minuten bei $270\text{ m}\mu$.

Die Tyrosinstandardlösungen werden genau so behandelt. Man fertigt mit ihrer Hilfe eine Eichkurve an, aus der man den Gehalt der Versuchslösung an freiem Tyrosin ablesen kann.

4. Injektion von hohen Dosen Dopa und Tyrosin.

Albinos des 4. Larvenstadiums wurde je Tier 10 mg Dopa oder Tyrosin, aufgeschwemmt in Phosphatpuffer, sehr langsam ins Abdomen injiziert.

Die Tiere wurden so lange beobachtet, bis sie das

5. Larvenstadiums erreicht hatten. Bei einigen wurde dann die Injektion mit Dopa wiederholt.

5. Transfusion von Wildformhämolymph auf Albinos.

Wie bei der Tyrosinase beschrieben ist, wurden drei Wildformlarven des 5. Stadiums Hämolymph entnommen und in einer Injektionsspritze aufgezogen. Sofort anschließend wurde die Hämolymph einem Albino des 3. Stadiums injiziert.

6. Transfusion von Albinohämolymph auf Wildformlarven.

Wie oben erklärt wurde, erhielt je eine Wildformlarve des 3. Stadiums Hämolymph von drei Albinos des 4. Stadiums.

Die Tiere wurden bis über die nächste Häutung hinaus beobachtet.

C. ERGEBNISSE

1. Verfolgung von injiziertem, markiertem Tyrosin bzw.

Dopa:

a) Verbrennung radioaktiver Cuticeln und radioaktiven Körperinhaltes.

Diese Versuche sollten zeigen, ob zwischen den Albinos und der Wildform wesentliche Unterschiede im Tyrosin-Stoffwechsel, besonders im Einbau von Tyrosin-Metaboliten in die Cuticula zu erkennen sind. Die Injektion der Vorstufen musste kurz vor einer Häutung erfolgen, da Sklerotisierung und Pigmentierung der Cuticula nur im Verlauf der Häutung stattfinden. In den einzelnen Versuchsserien wurden das Stadium der Tiere bei Injektion, die Zeit der Aufarbeitung und die Art der markierten Vorstufe variiert. In jeder Serie wurden Albino- und Wildform miteinander verglichen. Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen 1 bis 7 niedergelegt.

Die biologische Variation in der Entwicklung der Heuschrecken ist erheblich. Nicht einmal bei Tieren desselben Geleges findet die Häutung immer zur gleichen Stunde statt. Bei den letzten Häutungen kann die Variationsbreite zwischen den Individuen derselben Zucht beträchtlich sein. Sie hängt von der Temperatur, der Menge und Güte des Futters und, vor allem, von dem körperlichen Zustand des einzelnen Insektes ab. (Krüppel brauchen für die Entwicklung vom Ei bis zur Imago oft doppel so lange wie ihre gesunden Geschwister.)

Wir haben uns zwar bemüht, nur solche Tiere für dieselbe Serie zu verwenden, bei denen das Zeitintervall zwischen Injektion und Häutung möglichst konstant sein würde, aber wie die Versuchsergebnisse zeigten, ist uns das nicht immer gelungen. Aus diesem Grunde haben die einzelnen Tiere verschiedene Mengen des injizierten Materials in ihre alten Cuticeln eingebaut und mit den Exuvien abgeworfen. So war die Menge des aktiven Materials, die sie nach der Häutung zum Aufbau der neuen Cuticula verwenden konnten, unterschiedlich gross.

Da wir aber zum Vergleich zwischen Wildform und Albinos immer nur den Prozentsatz, den die Cuticulaaktivität an der Gesamtaktivität ausmacht, herangezogen haben, spielt die absolute Höhe der Ausgangsaktivität keine Rolle, solange die injizierte Menge so gering ist, dass sie den normalen Tyrosin- oder Dopaspiegel nicht beeinflusst.

Serie 1

Kurz vor der Häutung wurde Albino- und Wildformlarven des 4. Stadiums 0,02 ml einer L-Tyrosin-Lösung injiziert. Das Tyrosin war generell markiert. Jedes Tier erhielt 0,21 μ Curie. Injiziert wurden 20 Albino- und 20 Wildformlarven. Nach der Häutung zum 5. (letzten) Larvenstadium wurde aufgearbeitet. Die Counts pro mg Cuticula jeder Heuschrecke und der Anteil, den die Cuticulaaktivität an der gesamten, wiedergefundenen ausmacht, sind in der Tabelle 1 niedergelegt.

TABELLE 1

WILDFORM			ALBINOS	
Alter in Stunden	Counts/mg Cuticula	Anteil der Cuticula- aktivität an der Gesamtaktivität	Counts/mg Cuticula	Anteil der Cuticula- aktivität an der Gesamtaktivität
vor Htg.	505	3,7 %	691	20 %
"	266	10,5 %	273	8 %
"	177	4,7 %		
3 Std.n.H.	958	51,8 %	633	40,5 %
"	1163	67,6 %	503	40,2 %
"	1399	59,7 %		
12 Std.n.H.	864	61,0 %	895	51,8 %
"	1430	61,6 %	602	45,9 %
"	1106	54,9 %		
"	1071	59,2 %		
"	848	57,4 %		
24 Std.n.H.	1377	67,7 %	936	53,3 %
"	1208	66,0 %	812	55,6 %
"	1110	65,4 %		
48 Std.n.H.	999	73,2 %	1074	63,1 %
"	1131	66,7 %	997	61,0 %
"	1191	69,7 %	1002	63,2 %

Serie 2

Larven des 4. Stadiums erhielten am α C-Atom markiertes Dopa. 20 Albinos und 20 Normaltieren wurde je eine Aktivitätsdosis von $0,14 \mu$ Curie injiziert. Vor der folgenden Häutung starben 10 Albinos und 8 Normaltiere. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

(Tabelle 2 s.S.28)

TABELLE 2

WILDFORMALBINOS

Alter in Stunden	Counts/mg Cuticula	Anteil der Cuticula- aktivität an der Gesamtaktivität	Counts/mg Cuticula	Anteil der Cuticula- aktivität an der Gesamtaktivität
vor Htg.	531	17,0 %	274	61,0 %
"	854	41,0 %	105	37,0 %
"	1033	69,0 %		
3-12 Std.n.H.	395	57,0 %	210	50,0 %
"	307	56,0 %	195	53,0 %
12 Std.n.H.	564	71,0 %	120	56,0 %
"	324	69,0 %	174	71,0 %
24 Std.n.H.	539	56,0 %	1121	78,0 %
"	650	80,0 %	399	47,0 %
"	640	76,0 %		
48 Std.n.H.	308	63,0 %	715	72,0 %
"	570	69,0 %		

Serien 3 - 5

In den Serien 3 - 5 wurde die Metamorphose (Häutung zur Imago) untersucht. Nach Wigglesworth ist bei den Imagines von *Schistocerca* Melanin nur noch in Krallen, Mandibeln und Flügeln vorhanden. (33) Falls sich die Genmutation nur auf die Melaninsynthese erstreckt, müssten demnach die Versuchsergebnisse der Serien 3, 4 und 5 weitgehend übereinstimmen.

An Vorstufen wurden generell markiertes L-Tyrosin, am α C-Atom markiertes Dopa und ebenfalls am α C-Atom markiertes DL-Tyrosin injiziert. Die Ergebnisse der drei Serien sind in der Tabelle 3 zusammengefasst.

(Tabelle 3 s.S.30)

TABELLE 3

WILDFORM			ALBINOS		
Injizierte Substanz	Alter in Stunden	Counts/mg Cuticula	Anteil der Cuticulaaktivität an der Gesamtaktivität	Counts/mg Cuticula	Anteil der Cuticulaaktivität an der Gesamtaktivität
L-Tyrosin 0,27 µC.	vor Htg.	396	5,4 %	389	14,3 %
"	"			297	6,6 %
"	3-24 Std.n.H.	986	50,4 %	817	51,5 %
"	"	584	52,7 %	772	52,8 %
"	24-48 Std.n.H.	565	57,4 %	796	60,0 %
"	"	726	58,8 %	947	60,0 %
Dopa 0,12 µC. Vor Htg.		268	62,6 %	264	71,8 %
"	"			89	50,1 %
"	3-24 Std.v.H.	keine Akt.	0,0 %	58	56,9 %
"	"	"	0,0 %	13	25,5 %
"	24-48 Std.v.H.	"	0,0 %	keine Akt.	0,0 %
"	"	"	0,0 %	"	14,6 %

Fortsetzung der TABELLE 2

Injizierte Substanz	Alter in Stunden	WILDFORM		ALBINOS		
		Counts/mg Cuticula	Anteil der Cuticulak- tivität an der Gesamt- aktivität	Counts/mg Cuticula	Anteil der Cuticulak- tivität an der Gesamt- aktivität	
DL-Tyrosin 0,8 µC.	vor Htg.	262	31,7 %	144	16,7 %	
"	"	112	4,9 %	108	8,9 %	
"	3-24 Std.n.H.	178	39,3 %	183	32,6 %	
"	"	129	46,5 %	199	35,7 %	
"	24-48 Std.n.H.	146	67,5 %	194	47,6 %	
"	"	135	57,6 %	147	44,6 %	

Abhängigkeit der Aktivitätshöhe von der Intensität
der Sklerotisierung.

Serie 3

Der Nachweis einer Abhängigkeit der Radioaktivitätshöhe von der Intensität der Sklerotisierung wurde folgendermassen erbracht:

Von der Serie 3 wurde die hart sklerotisierte Beincuticula und die weichere Körpercuticula getrennt verbrannt. Das Verhältnis der gewonnenen Impulswerte pro mg war bei allen Tieren überraschend übereinstimmend.

Die harten Beincuticel der Albinos enthielten vor und nach der Häutung immer 10 % mehr Aktivität pro mg als die weicheren Körpercuticel. Vor der Häutung enthält die Beincuticula der Wildform ebenfalls 10 % mehr Aktivität pro mg als die Körpercuticula. Nach der Häutung liegt bei der Wildform der Unterschied zwischen 20 und 40 %.

(Tabelle 4 s.S.33)

TABELLE 4

Verhältnis der Radioaktivität von harter Bein cuticula zu weicher Körperc cuticula:

Alter in Bezug auf die Häutung	<u>WILDFORM</u>		<u>ALBINO</u>		Verhältnis 1. : 2.	Counts/mg Cuticula 2. Rumpf	Verhältnis 1. : 2.
	l. Bein	2. Rumpf	l. Bein	2. Rumpf			
vor Häutung	411	381	403	375	1,1 : 1		1,1 : 1
" "			316	279			1,1 : 1
12-24 Std. n. Häutung	1158	814	881	753	1,4 : 1		1,2 : 1
" "	642	524	823	721	1,2 : 1		1,1 : 1
24-48 Std. n. Häutung	657	474	831	761	1,4 : 1		1,1 : 1
" "	809	642	823	721	1,3 : 1		1,1 : 1

TABELLE 5

Übersicht über die in den Exuvien wiedergefundenen Radioaktivitätsmengen. Verwandt wurden die Albino-exuvien der Serien 1 - 5. Die Werte sind Durchschnittswerte.

Serie	Substrat	Lv.Std.	Injiz. Radio- aktiv.	Counts/mg Albino- exuvium
1	L-Tyrosin	4.	0,21 μ C.	45
2	Dopa	4.	0,14 μ C.	435
3	L-Tyrosin	5.	0,27 μ C.	221
4	Dopa	5.	0,12 μ C.	405
5	DL-Tyrosin	5.	0,08 μ C.	70

- - - - -

Die Höhe der Aktivität im abgeworfenen Exuvium hängt von der Zeit, die zwischen Injektion und Häutung verstrichen ist, ab.

Die Ergebnisse, die bei der Untersuchung der Aktivität der Exuvien von Serie 1 erhalten wurden, sind in Tabelle 6 und Abbildung 1 wiedergegeben. Die mitgeteilten Werte sind Durchschnittswerte aus 2 - 6 Exuvien, die zur selben Zeit nach der Injektion abgeworfen wurden.

(Tabelle 6 s.S.35)

TABELLE 6

<u>WILDFORM</u>		<u>ALBINOS</u>	
Stunden zwischen Injektion u.Häutung	Counts/mg Exuvium	Stunden zwischen Injektion u.Häutung	Counts/mg Exuvium
26	11	16	15
31	40	40	47
48	62	50	56
52	95	52	61
54	117		
56	140		
72	443	73	65

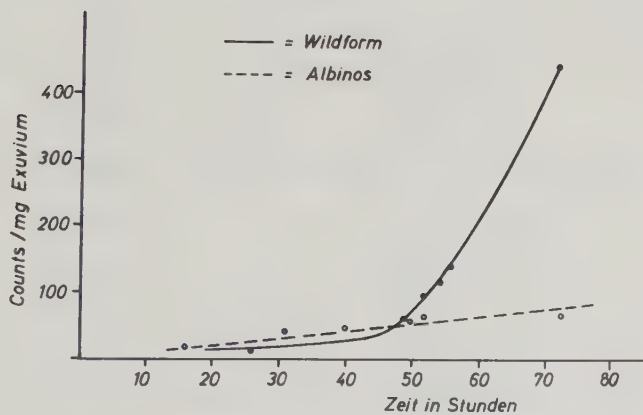


Abbildung 1: Anstieg der Aktivität im Exuvium in Abhängigkeit von der Zeit.

c. Vergleichsmessungen der Radioaktivität in Heuschrecken-
flügeln.

Serie 5

Die pigmentierten Anteile der Heuschreckenvorderflügel sind bei der Wildform intensiv schwarz, bei der Albino-
mutanten hellbraun gefärbt. Bei den Hinterflügeln sind nur
die feinen Äderchen ausgefärbt.

Verglichen wurden Albino- und Wildformflügel, Vorder-
und Hinterflügel sowie pigmentierte und pigmentlose Flügel-
anteile. Tabelle 7 zeigt die erhaltenen Ergebnisse.

TABELLE 7

Stunden n.Häutg.	Flügelteil	Counts/Min und mg	
		<u>WILDFORM</u>	<u>ALBINOS</u>
vor Häutung	Vorderflügel	308	86
" "	Hinterflügel	235	56
" "	Vorderflügel	103	52
" "	Hinterflügel	97	41
3-24 Std.n.Htg.	Vorderflügel	128	124
" "	Hinterflügel	117	120
" "	melaninhaltg. Vorderflügel	138	174
" "	Hinterflügel	122	156
" "	pigmentloser Vorderflügel	118	166
24-48 Std.n.Htg.	Vorderflügel	95	164
" "	Hinterflügel	100	195
" "	pigmentierter Vorderflügel	135	137
" "	Hinterflügel	129	137
" "	pigmentloser Vorderflügel	126	124

C. ERGEBNISSE, die sich aus den Tabellen 1 - 9 entnehmen lassen.

1. a) Nach Injektion von C^{14} -markiertem Tyrosin bzw. Dopa findet sich sowohl in der Wildformcuticula als auch in der Albinocuticula Radioaktivität. Die Höhe der Aktivität beweist, dass nicht eine einfache Eiweißsynthese, sondern ein spezifischer Stoffwechselgeschehen stattgefunden haben muss.
- b) Nicht nur die Cuticula, die während der auf die Injektion folgenden Häutung ausgebildet wird, ist radioaktiv, sondern auch die alte Cuticula, die zur Zeit der Injektion fertig sklerotisiert und ausgefärbt war.
- c) Es besteht zwischen der Wildform von *Schistocerca gregaria* und ihrer Albinomutanten kein qualitativer Unterschied in dem Vermögen, Tyrosin oder Dopa zum Aufbau der Cuticula zu verwenden.
2. Ein quantitativer Unterschied lässt sich bei Betrachtung der Serien 1 und 2 (Tabellen 1 und 2) erkennen. Vergleichstiere, die im selben Zeitabstand nach der Häutung getötet wurden, zeigen, dass die Wildformlarven jeweils 10 - 15 % mehr der Aktivität (bezogen auf die gesamte im Tier wiedergefundene Aktivität) in ihre Cuticula eingebaut haben als die Larven der Albinomutante.
3. Auch bei der Häutung zur Imago, die ja auch bei der Wildform kein Melanin besitzt, ist ein quantitativer Unterschied in der Einbaufähigkeit festzustellen.

4. Vergleicht man die Serien, die mit Dopa behandelt wurden, mit denen, die mit Tyrosin behandelt wurden, so wird deutlich, dass Dopa von Wildform und Albinos wesentlich schneller eingebaut wird. Besonders schön lässt sich das aus der hohen Aktivität der Albinoexuvien der Dopaserien (Tabelle 5) ableiten. Das Fehlen der Aktivität in den Wildformimaginees der Dopaserie 4, die geringe Cuticulaaktivität der gleichalten Albinos (die spezifische Cuticulaaktivität liegt nur wenig über dem Nulleffekt des verwendeten Zählapparates) und die hohe Aktivität der Exuvien der Serien 2 und 4 zeigen, wie rasch und vollständig Dopa in eine fertig sklerotisierte Cuticula eingebaut werden kann. Besonders schnell wird Dopa jedoch von den Larven der Wildform verwendet.
5. Die Einbauhöhe des markierten Dopa oder Tyrosins hängt stark von der Zeit ab. Der maximale Einbau in die neue Cuticula wird etwa 24 Stunden nach der Häutung erreicht. Ein Einbaumaximum in der alten, zur Zeit der Injektion schon völlig gehärteten Cuticula war mit unseren Methoden nicht festzustellen.
Aus der Tabelle 6 ersieht man jedoch, wie sehr auch die Einbaurate in die alte Cuticula von der Zeit abhängt.
6. Wildformlarven bauen nicht nur Dopa sondern auch Tyrosin schneller in ihre fertige Cuticula ein als Albino-larven. (Tabelle 6).

b) Auswertung der Radioautographien:

Die Radioautographien wurden nach einer Expositionszeit von 4 Monaten entwickelt und ausgewertet.

Es zeigte sich, dass die Autographien der Albino- und Wildformschnitte weitgehend übereinstimmen (Zeichnung 2). In allen Präparaten liess sich über derselben Schicht der Cuticula - wir nehmen an über der Exocuticula - ein intensiv schwarz gefärbtes Band in der Photoschicht erkennen. Die Wildformschnitte enthielten an einigen Stellen ein zweites, etwas schmaleres, leicht gewelltes, häufig unterbrochenes Band in der Photoschicht. (Zeichnung 2 C). Auch das zweite Band lag über der Cuticula; ob seine Entstehung Melaninbänden zu verdanken ist, ist fraglich.

Ausser den beiden beschriebenen schwarzen Bändern findet man gleichmässig über die Präparate verteilt einzelne schwarze Körnchen, die sich manchmal zu kleinen Ansammlungen verdichten. Wahrscheinlich ist an diesen Stellen radioaktives Material in den normalen Eiweissstoffwechsel einbezogen worden.

Die durch den Zerfall des aktiven Materials in der Photoschicht ausgefällten einzelnen Silberkörnchen lassen sich erst durch 800-fache Vergrösserung erkennen. Bei dieser Vergrösserung macht sich der Abstand zwischen Präparat und Photoschicht störend bemerkbar. Es lässt sich immer nur die Photoschicht oder das Präparat im Mikroskop klar einstellen. Aus diesem Grunde haben wir keine Photographien sondern nur Zeichnungen der Radioautographien hergestellt. (Abbildung 2 A - D)

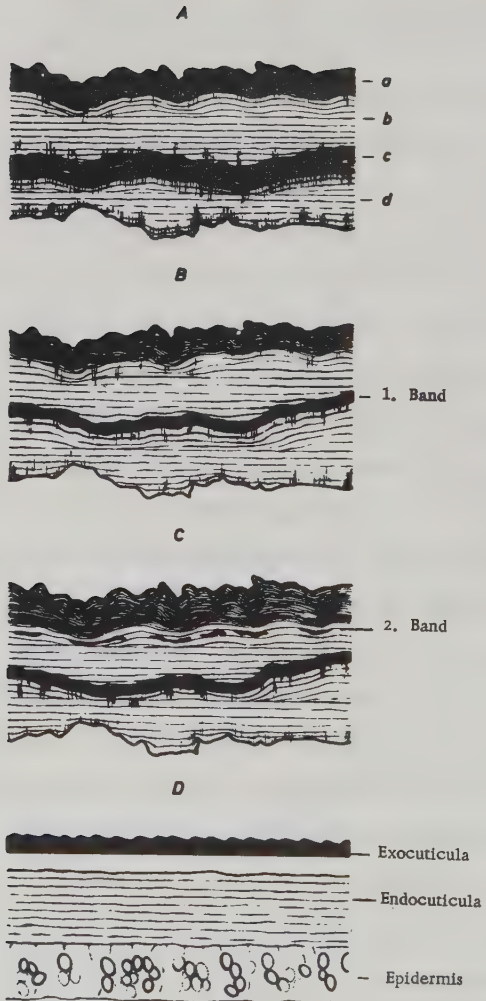


Abbildung: A - D

Abbildung A stellt einen schematisierten Ausschnitt, nämlich die Cuticula, aus einem unserer Präparate dar. Die geschwärzte Photoschicht wurde fortgelassen. Man erkennt vier verschieden dichte Schichten a - d, die durch unterschiedliche Schraffierung deutlich gemacht wurden.

In Abbildung B ist das bei Wildform und Mutante vorhandene geschwärzte Band der Photoschicht eingetragen. Seine Lage in der Photoschicht deckt sich mit der Schicht b der Cuticula.

Abbildung C zeigt das zweite unterbrochene Band, das zusätzlich zum ersten an einigen Stellen der Wildform-schnitte sichtbar wird. Seiner Lage in der Photoschicht entspricht die Grenze zwischen Schicht a und b der Cuticula.

Abbildung D ist ein von Malek (32) angegebener schematischer Schnitt durch die Cuticula einer 2 - 3 Tage alten Wildform von *Schistocerca*. Er diene dem Vergleich.

2. Ergebnisse der Tyrosinasebestimmung in Heuschrecken-homogenaten und Heuschreckenhämolymphe:

Im Gegensatz zu anderen Insekten (*Calliphora erythrocephala*, *Bombyx mori*, *Cecropia* zum Beispiel (30)) lässt sich bei *Schistocerca gregaria* nach Homogenisierung mit der Horowitzschen Methode keine Tyrosinaseaktivität feststellen. Auch die Hämolymphe von *Schistocerca* weist

nach der Versuchsanordnung von Horowitz (29), nach der nur das Tyrosinase-haltige Material, Dopalösung und Phosphatpuffer zusammengegeben werden, keine messbare Enzymaktivität auf. Erst nach Zugabe von katalytischen Mengen Kupfersulfat ist eine sofort messbare Tyrosinase-aktivität in der Hämolymphe zu beobachten. Allerdings ist diese Aktivität im Vergleich zu der Aktivität weisser Vorpuppen von *Calliphora erythrocephala* immer noch sehr gering.

Die Tabellen 8 bis 11 und die Abbildung 3 bis 6 geben die Ergebnisse der Tyrosinasebestimmung der Hämolymphe, bei denen Substrat und Stadium der Tiere variiert wurden, wieder. Die mitgeteilten Werte sind jeweils einem Versuch entnommen. Mehrmalige Wiederholungen ergaben ähnliche Resultate.

In allen Abbildungen sind die Photometereinheiten in Hundertsteln angegeben.

Versuche:

Versuch 1: Hämolymphe von 2 Wildform- oder Albinolarven des 4. Stadiums.

Substrat:Dopa

Die Ergebnisse sind unter 1a - 1c und in Abbildung 3 zusammengefasst.

1a) Puffer + Hämolymphe

1b) Puffer + Hämolymphe + Dopa

Nach 10 Minuten weder mit Wildform- noch Albinohämolymphe eine Extinktion.

TABELLE 8

1c) Puffer + Hämolymphe + Dopa + CuSO_4

Zeit	Extinktion	
	Wildform	Albinos
1 Min.	0,07	0,35
2 "	0,17	0,50
3 "	0,26	0,58
4 "	0,36	0,66
5 "	0,45	0,74
7 "	0,63	0,88

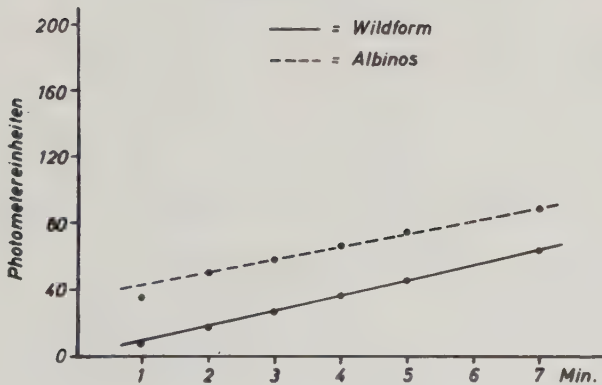


Abbildung 3: Graphische Darstellung der Tabelle 8

Versuch 2: Hämolymph von 2 Wildform- oder Albinolarven
des 4. Stadiums.

Substrat: Brenzkatechin.

Die Ergebnisse sind unter 2a - 2c und in Abbildung 4 zusammengefasst.

2a) Puffer + Hämolymph 2b) Puffer + Hämolymph + Brenzkatechin

Nach 10 Minuten weder mit Wildform- noch Albinohämolymph eine Extinktion.

TABELLE 9

2c) Puffer + Hämolymph + Brenzkatechin + CuSO_4

Zeit	Extinktion	
	Wildform	Albinos
1 Min.	0,25	0,06
2 "	0,54	0,17
3 "	0,80	0,27
4 "	1,05	0,36
5 "	1,27	0,45
7 "	1,65	0,60

(Abb. 4 s.S. 45)

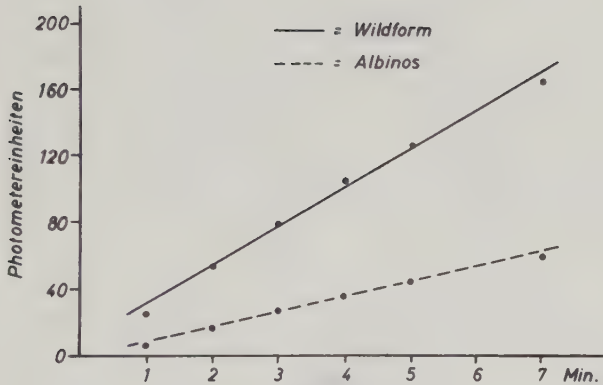


Abbildung 4: Graphische Darstellung der Tabelle 9.

Versuch 3: Hämolymphe von Wildform- oder Albinoimagines.

Substrat: Brenzkatechin

Ergebnis: s. unter 3a - 3c und Abbildung 5.

3a) Puffer+Hämolymphe 3b) Puffer+Hämolymphe+Brenzkatechin

Nach 10 Minuten weder mit Wildform- noch Albino-
hämolymphe eine Extinktion.

TABELLE 10

3c) Puffer + Hämolymphe + Brenzkatechin + CuSO_4

Zeit	Extinktion	
	Wildform	Albinos
1 Min.	0,68	0,11
2 "	0,95	0,19
3 "	1,12	0,28
4 "	1,30	0,36
5 "	1,41	0,45
7 "	1,65	0,64

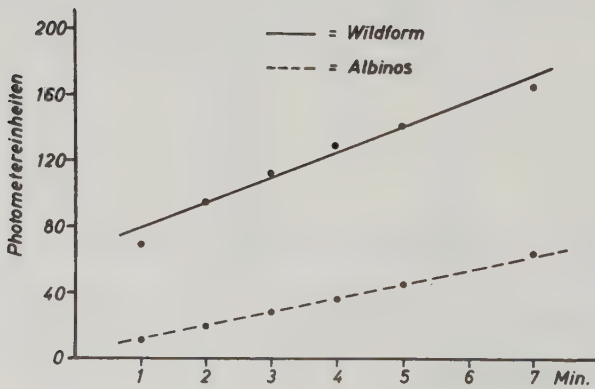


Abbildung 5: Graphische Darstellung der Tabelle 10

Versuch 4:

Kontrollversuch: s. Tabelle 11 und Abbildung 6

Hämolymphe von drei Wildformlarven des 4. Stadiums,
Puffer und CuSO_4

TABELLE 11

Zeit	Extinktion
1 Min.	0,25
2 "	0,32
3 "	0,37
4 "	0,42
5 "	0,45
7 "	0,48

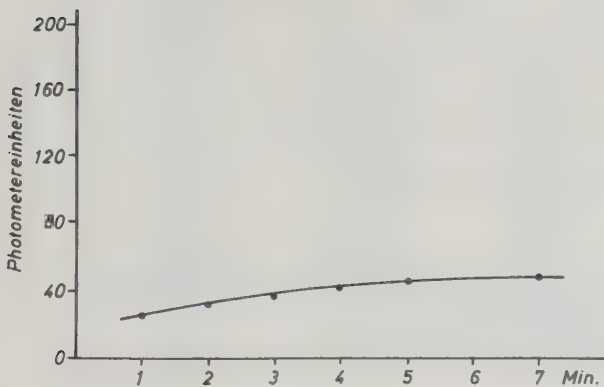


Abbildung 6: Graphische Darstellung der Tabelle 11

Auswertung der Tabellen 8 bis 11 und der Abbildungen
3 bis 6.

Die Extinktionshöhe bei Larven der Wildform und der Albinomutanten sowie bei jungen Imagines beider Rassen liegt in der gleichen Grössenordnung. Man kann demnach nicht von einem auffallenden Unterschied der Tyrosinaseaktivität sprechen. Bei allen Versuchen, bei denen Brenzkatechin als Substrat verwendet wurde, zeigen die Vertreter der Wildform eine etwas höhere Aktivität (bis zu 0,2 Photometereinheiten in der Minute, vergleiche Abbildung 4 und 5). Bei der Verwendung von Dopa als Substrat war der Unterschied zwischen der Tyrosinase von Albino- und Wildformhämolymphe nie grösser als 0,04 Photometereinheiten in der Minute (Abbildung 3).

Die Werte des Kontrollversuches beruhen auf einer Oxydation des in der Hämolymphe frei vorhandenen Tyrosins und Dopas zu Dopachrom. Dass bei diesem Versuch die Werte nicht linear ansteigen, beruht wahrscheinlich auf der sehr geringen Substratmenge.

c. Ergebnisse der Tyrosinbestimmung im Körperinhalt
von Schistocerca gregaria.

Wir verwendeten den Rest des Körperinhaltes der Verbrennungsserie 3 und rechneten dann auf die im gesamten Körperinhalt vorhandene Menge an freiem Tyrosin um.

Es ergab sich, dass der Tyrosingehalt kurz vor der Häutung bei beiden Formen von *Schistocerca* bedeutend höher ist als nach der Häutung. Bei der Wildform nimmt der Tyrosingehalt des Körperinhaltes schneller und stärker nach der Häutung ab als bei der Mutanten (s. Abbildg. 7).

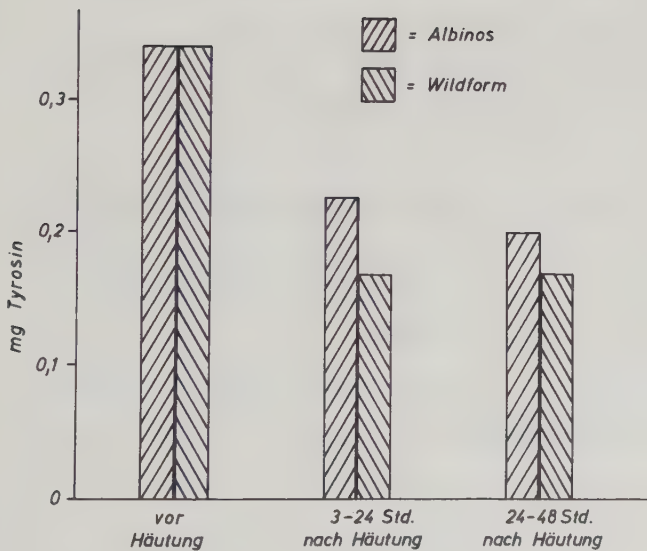


Abbildung 7: Tyrosingehalt des Körperinhaltes von Wildform und Mutante während der Häutung.

4. Ergebnisse der Injektion hoher Dosen von Dopa und Tyrosin in Albinolarven.

Von den 10 Albinolarven des 4. Stadiums, die je 10 mg Dopa erhalten hatten, starben 5 nach einigen Stunden. Die toten Tiere verfärbten sich tiefschwarz.

Die lebenden Tiere zeigten auch nach der folgenden Häutung kein Melaninmuster.

Von den 10 Albinolarven - sie befanden sich ebenfalls im 4. Stadium - die je 10 mg L-Tyrosin erhalten hatten, starben 4 kurz nach der Injektion. Diese 4 blieben jedoch hell.

Von den übrigen 6 überlebten 4 die nächste Häutung ohne sich davor oder danach auszufärben.

5. und 6. Ergebnisse der Hämolyphentransplantationen:

Die Hämolymphe-Transplantationen von Wildformlarven auf Albinos und von Albinolarven auf Wildformlarven hatten keinen sichtbaren Effekt.

Die Färbung der Tiere blieb auch nach der folgenden Häutung unbeeinflusst.

D) DISKUSSION DER VERSUCHSERGEBNISSE

I. Auffinden des Erfolgsortes der Genmutation:

Wie in der Einleitung erwähnt, hoffte ich, mit der vorliegenden Arbeit den Erfolgsort der Genmutation, die das Fehlen der Melanin-Produktion bei der Albino-Mutante von *Schistocerca gregaria* bedingt, feststellen zu können.

Nach der Theorie, dass die Mutation eines Gens die Produktion oder Aktivierung eines Fermentes verhindert, wurde zunächst an eine Blockierung des Phenolase-Komplexes, von dem bekannt ist, dass er wichtige Schritte der Melanin-Synthese katalysiert, gedacht. Die Erkenntnis, dass die Blut-Tyrosinase, die ausschlaggebend für die Melanin-Bildung sein soll, bei der Wildform und der Mutante eine nahezu gleich hohe Aktivität aufweist, macht die genetisch bedingte Blockierung dieses Fermentes durch die Mutation unwahrscheinlich.

Die Möglichkeit, dass ein bisher noch unbekanntes Ferment der Melanin-Synthese durch die Mutation betroffen ist, versuchten wir dadurch zu prüfen, dass wir Wildform-Hämolymphe auf Albinos transfundierten. Der negative Ausgang dieses Versuches beweist, dass mindestens in der Hämolymphe der Wildform kein für die Melanin-Synthese notwendiges Ferment enthalten ist, das der Mutante fehlt. Es lässt sich jedoch nicht ausschliessen, dass ein solches Ferment in der Cuticula der Wildform vorhanden ist.

Eine weitere Möglichkeit für das Fehlen des Melanins ist das Auftreten von Inhibitoren bei den Albino-Mutanten. Da jedoch nach der Transfusion von Albino-Hämolymphe der

Wildform-Larven deren Ausfärbung bis nach der folgenden Häutung völlig unbeeinflusst bleibt, ist das Vorhandensein von Inhibitoren in der Hämolymphe der Mutante zu verneinen. Ihr Vorkommen nur in der Cuticula ist unwahrscheinlich.

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit beruht das Fehlen der Melanin-Bildung bei der Albino-Mutante von *Schistocerca gregaria* wahrscheinlich darauf, dass durch die Mutation eine quantitative Änderung des Tyrosin-Stoffwechsels im Sinne einer Schwächung erfolgt:

- 1.) Qualitativ unterscheiden sich Wildform und Mutante bezüglich des Gehalts an freiem Tyrosin und der Tyrosinase-Aktivität in der Hämolymphe nicht; somit sind auch bei der Mutante die Voraussetzungen wenigstens der ersten Schritte der Melanin-Synthese gegeben.
- 2.) Inhibitoren für die Melanin-Synthese könnten in der Hämolymphe der Mutante nicht nachgewiesen werden.
- 3.) Quantitativ war bei allen Experimenten der Tyrosin-Stoffwechsel der Mutante gegenüber dem der Wildform verringert und ausserdem verzögert. So baut die Mutante markiertes Tyrosin bzw. Dopa langsamer und geringgradiger in ihre Cuticula ein als die Wildform; ihre Tyrosinase-Aktivität in der Hämolymphe ist verringert. Der Spiegel des freien Tyrosins. der vor der

Häutung bei beiden Formen gleich hoch ist, fällt bei der Mutante nach der Häutung langsamer und schwächer ab als bei der Wildform. Die verringerte Dopa-Bildung kann nicht die einzige Ursache für die Blockierung der Melanin-Synthese sein, denn nach hohen Dopa-Gaben tritt keine Ausfärbung der Albinos ein.

- 4.) Andere Beobachtungen, wie das vermehrte Auftreten von Krüppeln und Toten bei den Häutungen und die verzögerte Entwicklung der Albinos, weisen auf eine durch die Mutation bedingte allgemeine Herabsetzung des Stoffwechsels hin.

Durch die Versuchsergebnisse kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch die Mutation die letzten, in der Cuticula stattfindenden Schritte der Melanin-Bildung oder die Bereitstellung spezifischer Eiweissträger für die Melanine unterbrochen sind.

II. Zum Verhältnis der beiden Tyrosin-Stoffwechsel-Wege zueinander.

Auf Grund der Ergebnisse, die aus den Versuchen über die Verteilung von radioaktiv markiertem Tyrosin bzw. Dopa gewonnen wurden, lässt sich sagen, dass die Sklerotin-Synthese der bevorzugte Weg des Tyrosin-Stoffwechsels bei *Schistocerca gregaria* darstellt,

während die Melanin-Bildung nur einen Nebenweg ausmacht.

- 1.) Der Unterschied in der Radioaktivität von Wildform und Albino-Cuticeln ist nicht sehr erheblich.
- 2.) Stärker sklerotisierte Cuticula-Anteile weisen um 10 bis 40 % mehr Aktivität auf als schwächer sklerotisierte Cuticula-Anteile des-selben Tieres (Tabelle 4). Hochgradig melanisierte Cuticula-Anteile haben keine besonders hohe Aktivität (Vergleichsmessungen der Heuschreckenflügel).

III. Auftreten von Radioaktivität in der alten Cuticula und den Exuvien:

Ein zunächst überraschender Nebenfund der Arbeit war, dass sowohl die Wildform als auch die Mutante fähig ist, in ihre alte, zur Zeit der Injektion fertig sklerotisierte und melanisierte Cuticula einen beträchtlichen Teil des markierten Materials einzubauen.

Der Einbau kann m.E. nur in die von Malek (32) beschriebene Ecdysialmembran erfolgt sein. Die Ecdysialmembran bildet sich am Ende eines jeden Stadiums zwischen der alten Endocuticula und der neuen Exocuticula. Sie verklebt schliesslich mit der alten Endocuticula und wird mit dem Exuvium abgeworfen.

Interessant war, dass die Wildform wesentlich schneller aktives Material in ihre Ecdysialmembran einbauen kann als die Mutante. Es findet sicher keine Melaninsynthese mehr statt, d.h. auch diese Tatsache weist auf einen verzögerten Stoffwechsel des Albinos hin.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Die Wildform von *Schistocerca gregaria* enthält in der Cuticula während der Larvenstadien Sklerotin und Melanin, während eine Albino-Mutante zur Pigmentbildung nicht mehr befähigt ist. Muttersubstanz sowohl des Sklerotins als auch des Melanins ist Tyrosin. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht zu klären, auf welche Weise die Gen-Mutation den Tyrosin-Stoffwechsel der Albino-Mutante gegenüber der Wildform beeinflusst. Folgende Experimente wurden an den beiden Heuschrecken-Rassen durchgeführt:

- 1.) Verfolgung von injiziertem, radioaktivem Tyrosin bzw. Dopa;
- 2.) Bestimmung der Phenoloxydase-Aktivität in der Hämolymphe;
- 3.) Bestimmung des freien Tyrosins im Körperinhalt;
- 4.) Injektionen grosser Dopa- bzw. Tyrosin-Mengen;
- 5.) Wechselseitige Transfusionen von Hämolymphe.

Aus den Ergebnissen ist zu schliessen, dass bei *Schistocerca gregaria* die Sklerotin-Synthese den Hauptweg, die Melanin-Bildung einen Nebenweg des Tyrosin-Stoffwechsels darstellt. Die Gen-Mutation bewirkt eine Schwächung dieses Stoffwechsels, wodurch die Sklerotin-Produktion in geringem Grad verringert wird. Die Mutante enthält die wichtigsten Vorstufen des Melanins. Injektion von Melanin-Vorstufen führt nicht zu einer Pigmentierung. Ob bei der Albino-Mutante das Fehlen der Melanin-Bildung nur durch die Verminderung des Tyrosin-Stoffwechsels

oder zusätzlich noch durch das Fehlen von strukturegebundenen, in der Cuticula lokalisierten Fermentsystemen oder Trägerproteinen zustande kommt, konnte nicht entschieden werden.

F. TABELLARISCHER ANHANG.

Erweiterte Tabellen über die Verbrennungsversuche:

Zusatztablelle zu Tabelle 1: (L-Tyrosin injizierte Larven des 4. Stadiums,

WILDFORM

Alter in Stunden	Counts/mg Cuticula	Counts/mg Inneres	Gesamtcounts/ Cuticula	Gesamtcounts/ Inneres	Gesamtcounts/ Tier	Prozentsatz der Cuticula
vor Htg.	177	417	1823	36891	38614	4,7
"	266	384	3910	32186	36096	10,8
"	505	487	1104	28392	29397	3,7
3 Std.n.H.	958	279	24908	23157	49065	51,8
"	1163	202	36259	17372	53631	67,6
"	1399	197	28260	19109	47369	59,7
12 Std.n.H.	864	206	29246	18725	47971	61
"	1430	318	30459	19016	49475	61,6
"	1106	322	23558	19320	42878	54,9
"	1071	247	23990	16549	40539	59,2
"	848	352	23313	17197	40510	57,4

Fortsetzung der Zusatztabelle 1:

WILDFORM

Alter in Stunden	Counts/mg Cuticula	Counts/mg Inneres	Gesamtcounts / Cuticula	Gesamtcounts / Inneres	Tier	Prozentsatz der Cuticula
24 Std.n.H.	1377	187	33599	16045	49644	67,7
"	1208	246	31650	16285	47935	66
"	1110	196	32412	17130	49542	65,4
48 Std.n.H.	999	139	39860	14456	54316	73,2
"	1131	213	38454	19170	57624	66,7
"	1191	197	32157	13987	46144	69,7

Fortsetzung der Zusatztabelle 1:

ALBINOS

Alter in Stunden	Counts/mg Cuticula	Counts/mg Inneres	Gesamtcunts/ Cuticula	Gesamtcunts/ Inneres	Gesamtcunts/ Tier	Prozentsatz der Cuticula
vor Htg.	691	612	10316	41249	51565	20
"	273	388	4873	55678	60551	8
3 Std.n.H.	633	278	15192	22351	37543	40,5
"	503	280	17706	26376	44082	40,2
12 Std.n.H.	895	273	24792	23099	47891	51,8
"	602	227	16796	19794	36590	45,9
24 Std.n.H.	1074	318	20084	11766	31850	63,1
"	997	257	23928	15303	39231	61
"	1002	270	26976	15654	42630	63,2

Zusatztablette zu Tabelle 2: (Dopa injiziert Larven des 4. Stadiums)

Alter in Stunden	WILDFORM				Gesamtcuticula	Gesamtcuticula/ Inneres	Gesamtcuticula/ Inneres	Gesamtcuticula/ Tier	Prozentsatz der Cuticula an Ges.
	Counts/mg Cuticula	Counts/mg Inneres	Counts/mg Inneres	Counts/mg Cuticula					
vor Htg.	531	450		9027	43403		52430		17
"	854	347		18959	27691		46650		41
"	1033	87		15495	6886		22391		69
3-12 Std.n.H.	395	93		17578	13499		31077		57
"	307	110		5618	4461		10079		56
12 Std.n.H.	564	86		19966	8200		28166		71
"	324	64		8651	3814		12565		69
24 Std.n.H.	539	145		13823	10948		24771		56
"	650	61		38870	9425		48295		80
"	640	59		12240	3865		16105		76
48 Std.n.H.	308	61		11519	6719		18238		63
"	570	63		14651	6567		21182		69

Fortsetzung der Zusatzztabelle 2:

ALBINOS

Alter in Stunden	Counts/mg Cuticula	Counts/mg Inneres	Gesamtcounts/ Cuticula	Gesamtcounts/ Inneres	Gesamtcounts/ Tier	Prozentsatz der Cuticula an Ges.
vor Htg.	274	41	5179	3301	8480	61
"	105	31	950	1609	2559	37
3-12 Std.n.H.	210	39	5223	5223	10446	50
"	195	35	4312	3824	8136	53
12 Std.n.H.	120	35	2844	2272	5116	56
"	174	40	4132	1708	5840	71
24 Std.n.H.	1221	100	28327	8065	36392	78
"	399	179	9376	10382	19758	47
48 Std.n.H.	715	91	22737	8763	31500	72

Zusatztabelle zu Tabelle 3 (L-Tyrosin injiziert Larven des 5. Stadiums)

Alter in Stunden	<u>WILDFORM</u>					Prozentsatz der Cut.akt.
	Counts/mg Cuticula	Counts/mg Inneres	Gesamtcounts/ Cuticula	Gesamtcounts/ Inneres	Gesamtcounts/ Tier	
vor Htg.	396	447	9588	169078	178665	5,4
3-24 Std.n.H.	986	325	60917	59951	120867	50,4
"	584	176	43026	38610	81636	52,7
24-48 Std.n.H.	565	188	76866	57023	133889	57,4
"	726	213	60914	42651	103565	58,8

Fortsetzung der Zusatztablelle 3:

ALBINOS

Alter in Stunden	Counts/mg Cuticula	Counts/mg Inneres	Gesamtcounts/ Cuticula	Gesamtcounts/ Inneres	Gesamtcounts/ Tier	Prozentsatz der Cut.akt.
vor Htg.	389	432	27758	166042	193799	14,3
"	297	493	15292	217520	232813	6,6
3-24 Std.n.H.	817	272	75336	71960	147297	51,1
"	772	195	59668	53348	113016	52,8
24-48 Std.n.H.	796	209	70773	47237	118010	60
"	947	237	88005	58824	146830	60

Zusatztabelle zu Tabelle 3: (Dopa injiziert Larven des 5. Stadiums)

WILDFORM

Alter in Stunden	Counts/mg Cuticula	Counts/mg Inneres	Gesamtcounts / Cuticula	Gesamtcounts / Inneres	Gesamtcounts / Tier	Prozentsatz der Cut.akt.an Ges.
vor Htg.	268	28	15286	9145	24432	62,6
3-24 Std.n.H.	keine Aktiv.	k.Akt.	k.Akt.	k.Akt.	k.Akt.	0
"	"	"	"	"	"	0
24-48 Std.	"	"	"	"	"	0
"	"	"	"	"	"	0

Fortsetzung der Zusatztablelle 3:

ALBINOS

Alter in Stunden	Counts/mg Cuticula	Counts/mg Inneres	Gesamtcounts/ Cuticula	Gesamtcounts/ Inneres	Gesamtcounts/ Tier	Prozentsatz der Cut.akt.an Ges.
vor Htg.	264	29	20484	8082	28546	71,8
"	89	16	5512	5492	11004	50,1
3-24 Std.n.H.	58	15	6492	4924	11416	56,9
"	13	12	1269	3707	4926	25,5
24-28 Std.n.H.	keine Akt.	13	keine Akt.	1229	1229	0
"	11	21	1075	6290	7365	14,6

Zusatztablelle zu Tabelle 3 : (DL-Tyrosin injiziert Larven des 5. Stadiums)

Alter in Stunden	<u>WILDFORM</u>					
	Counts/mg Cuticula	Counts/mg Inneres	Gesamtcounts/ Cuticula	Gesamtcounts/ Inneres	Gesamtcounts/ Tier	Prozentsatz der Cut.akt.
vor Htg.	262	88	10869	23466	34335	31,7
"	112	148	2279	46708	44429	4,9
Std.n.H.	178	67	8924	13814	22739	39,3
"	129	37	8135	9379	17513	46,5
Std.n.H.	146	42	14067	6791	20878	67,5
"	135	39	13475	9966	23411	57,6

Fortsetzung der Zusatztabelle 2

ALBINO S

Alter in Stunden	Counts/mg		Counts/mg		Gesamtcounts /		Gesamtcounts /		Gesamtcounts /		Prozentsatz	
	Cuticula	Inneres	Cuticula	Inneres	Cuticula	Inneres	Cuticula	Inneres	Tier	der Cut.akt.		
vor Htg.	144	120	7441	37035			44476			16,7		
"	108	125	3823	39287			43092			8,9		
3-24 Std.n.H.	183	74	10113	20926			31038			32,6		
"	199	58	11372	20443			36815			35,7		
24-48 Std.n.H.	194	50	10212	11228			21441			47,6		
"	147	38	9079	11295			20374			44,6		

L i t e r a t u r - V e r z e i c h n i s

- 1.) A.Kühn, Nachr.Akad.Wiss.Göttingen, math.physikal.
Klasse 1941, S.231;
- 2.) A.Butenandt, Angew.Chemie 61, 262, (1949);
- 3.) A.Butenandt, Tisza Istvan-Ges.d.Wiss., Debrecen 1943;
- 4.) G.W.Beadle, Z.f.Naturf. 3b, 63, (1948);
- 5.) G.W.Beadle, Fortschr.Chem.org.Naturst. 5, 300, (1948);
- 6.) A.Butenandt, Naturw. 40, 91, (1953);
- 7.) P.Karlson, Erg.d.Enzymf. 13, 85, (1954);
- 8.) E.Becker, Zeitschr.f.indukt.Abst. u.Vererbungslehre
80, 157, (1942);
- 9.) M.G.M.Pryor, Proc.Roy.Soc. B.128, 393, (1940);
- 10.) R.H.Hackman, Bioch.J. 54, 371, (1953);
- 11.) R.A.J.Gordner, J.biol.Ch. 10, 89, (1911);
- 12.) H.S.Raper, Bioch.J. 21, 89, (1927);
- 13.) R.H.Hackman u.A.R.Todd, Bioch.J. 55, 631, (1953);
- 14.) M.G.M.Pryor, Proc.Roy.Soc. B 128, 378, (1940);
- 15.) M.G.M.Pryor, Nature 159, 399, (1947);
- 16.) M.G.M.Pryor, Nature 175, 600, (1955);
- 17.) P.Karlson, Z.physiol.Ch. 318, 194, (1960);
- 18.) H.S.Mason, Adv.Enzymol. 16, 105, (1955);
- 19.) P.Karlson, Verhdlg.d.Dtsch.Zool.Ges.Tübingen 1954,
S.68;
- 20.) A.Glenn Richards, Erg.Biol. 20, 1, (1958);
- 21.) P.Karlson und S.Sekeris, in Vorbereitung;
- 22.) P.Karlson, Lehrbuch der Biochemie, Stuttgart 1960,
S.127;

- 23) S.R.A.Malek, Nature 180, 237, (1957);
- 24) P.Hunter-Jones, Instructions for rearing and breeding locusts in laboratory, Anti-Locust Research Centre, London 1956;
- 25) D.D.van Sylke u.J.Folch, J.biol.Ch. 136, 509, (1940);
- 26) M.Calvin, Ch.Heidelberger, J.C.Reid, B.M.Tolbert und P.Yankwich, Isotopic Carbon, London 1949, S.22;
- 27) W.D.Armstrong und J.Schubert, Anal.Chem. 20, 270, (1948);
- 28) S.R.Pelc, Nature 160, 749, (1947); G.A.Boyd u. A.J.Williams, Proc.Soc.exptl.Bio.Med. 69, 225, (1948); a.M.MacDonald, J.Cobb und A.K.Solomon, Science 107, 550, (1948);
- 29) N.H.Horowitz u.M.Fling, Genetics 38, 360, (1953);
- 30) J.W.Lugg, Bioch.J. 31, 1422, (1937);
- 31) A.Schweiger, Dissertation, München 1960;
- 32) S.R.A.Malek, J.Ins.Physiol. 2, 298, (1948);
- 33) V.B.Wigglesworth, Physiologie der Insektenkunde, Basel und Stuttgart 1955, S.615;

Lebenslauf

Am 11.4.1935 wurde ich als Tochter des Patentanwaltes Dr. Bernhard Raecke und seiner Ehefrau Elisabeth geb. Piel, in Düsseldorf geboren.

Ich besuchte neun Jahre lang die Städtische Luisenschule in Düsseldorf und bestand im Frühjahr 1955 das Abitur des mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweiges. Zum Sommersemester immatrikulierte ich mich an der Medizinischen Fakultät der Universität Köln. Zum Wintersemester 1955/1956 ging ich nach München und blieb dort bis auf ein Wiener Sommersemester (1958). Im Sommersemester 1957 legte ich das Physikum, im Frühjahr 1961 das Staatsexamen ab. In den Städtischen Krankenanstalten Düsseldorf führte ich im Frühjahr 1955 das vorgeschriebene Krankenpflege-Praktikum durch. Ich famulierte im Sommer 1958 am Evangelischen Krankenhaus in Düsseldorf und im Herbst 1960 an der II. Medizinischen Universitätsklinik in München. Meine Doktorarbeit fertigte ich in der Zeit vom 1. November 1958 bis zum 1. April 1960 am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität München an.

